



TITLE:

Chronological profiling of plasma native peptides after hepatectomy in pigs: Toward the discovery of human biomarkers for liver regeneration(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Iguchi, Kota

CITATION:

Iguchi, Kota. Chronological profiling of plasma native peptides after hepatectomy in pigs: Toward the discovery of human biomarkers for liver regeneration. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20240>

RIGHT:

京都大学	博 士（ 医 学 ）	氏 名	井 口 公 太
論文題目	Chronological profiling of plasma native peptides after hepatectomy in pigs: Toward the discovery of human biomarkers for liver regeneration (肝切除術ブタの血漿内因性ペプチドの経時的プロファイリング：ヒト肝再生バイオマーカー発見にむけて)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景と目的】肝切除術後に見られる肝再生は、多数のシグナル経路により時間依存的に制御された生物学的過程である。術後肝再生の不十分な症例では、肝不全症を発症し、術後死亡の重大な要因となる。したがって術後肝再生を鋭敏に、特異性高く予測可能な血中バイオマーカーを発見することは、肝臓外科領域において重要な課題である。一般的に血中タンパク質の大部分は、肝臓で合成されることから、脂肪肝、肝細胞癌などの肝疾患への罹患により血漿プロテオームは、経時的に変化することは、よく知られている。一方、内因性の血漿中低分子ペプチドを対象としたバイオマーカー探索については、これまでにまとまった報告はなかった。本研究では、ヒトに遺伝学的・生理学的に近いブタを実験モデルとして使用し、肝切除後肝再生過程の各ステージに対応した血漿ペプチドプロファイルを取得し、バイオマーカーとなり得る分子の抽出と同定を試みた。</p> <p>【方法】1.5-2 歳齢の雌性マイクロミニブタ 5 頭に対して、70%肝切除を施行した。肝切除後 0 min, 1, 3, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 時間 (h) 後に採血し、血漿を回収した。血漿 3μl 中の内因性ペプチドを C8 磁性ビーズにて精製し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) にて質量分析を行い、さらに多変量解析や機械学習法の統計解析を行った。タンパク質の同定には nano LC (ナノフロー液体クロマトグラフ) -MALDI-TOF MS/MS を使用した。京都大学医学部肝胆膵・移植外科における肝切除 4 症例のヒト血漿を使用し、同様の解析を実施した。</p> <p>【結果】肝切除後の血漿内因性ペプチドのプロファイルは、経時的に明らかな変動を示すことが主成分分析から明らかとなった。さらに全観察期間を通して急性期 (24 h) と回復期 (120 h) に特徴的な二峰性の変化を認めた。急性期には、ヘモグロビンα鎖 (HBA) 断片、回復期にはアルブミン (ALB) 断片によって特徴付けられたプロファイルを得られた。特に回復期において、ALB の N 端ペプチド短鎖 (3028, 3042 <i>m/z</i>) は低下する一方で、N 端ペプチド長鎖 (8926 <i>m/z</i>) は増加していた。このようなマーカー候補ペプチドの同定を nano LC-MALDI-TOF MS/MS にて行ったところ、肝切除直後 (0 min) に多種類のヒストン断片が検出され、超急性期における肝再生との関連が示唆された。ヒト血漿においても、肝切除後 0, 24, 48, 168 h にかけてペプチドの明らかな変動が観察された。中でも 2378, 9080 <i>m/z</i> は、最も有意な変化を示すペプチドとして抽出された。2378 <i>m/z</i> は補体 C4b 断片として同定された。</p> <p>【考察】本研究では、ブタ肝切除後の血漿内因性ペプチドの経時的プロファイルを明らかにした。超急性期をはじめ急性期や回復期に特異的な血漿ペプチドの抽出と配列を明らかにした。血漿中の内因性ペプチドは、同一のタンパク質由来であってもエピトープによって生体内で異なる挙動を示し、肝疾患病態下のプロテアーゼ活性変化、またはタンパク質合成過程を反映しているものと考えられ</p>			

<p>た。本研究の成果により、ブタなどの大動物モデルを対象に、肝疾患特異的な血漿内因性ペプチドのバイオマーカーを発見することが可能であると考えられた。今後は臨床研究による検証を行うことにより、バイオマーカーとしての安定性の評価が必要であると考えられた。また、本研究によってブタを医学研究に有効利用する上で貴重な血漿内因性ペプチドに関する知見の得られたものと考えられた。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>ブタは齧歯類よりヒトに近い非霊長類であり、動物愛護・研究倫理の観点からイヌ・サルに代わる大動物実験モデルとして期待される。ブタは一個体から複数回の標本採取が可能であり、時間経過を考慮したプロテオームを構築することで肝臓関連のマーカー探索や病態の理解が期待される。</p> <p>近年の質量分析技術の進展により、一検体あたりの取得データが膨大になる一方、複雑な病態を反映する単一分子マーカーを抽出することは困難である。本研究はブタ肝切除モデルにおいて、タンパクチップ技術と MALDI 型質量分析計による解析システムである ClinProt システムを導入し、周術期血漿から有用なマーカーを抽出するため、多変量解析と機械学習法を駆使しマーカーペプチドを用いた診断パネルの構築を試みたものである。その結果、ブタ肝切除後の血漿ペプチドームは病態を鋭敏に反映して刻一刻と変化し、超急性期から急性期、回復期とステージ毎に再現性の高いペプチド断片、即ちヒストン、HBA、ALB などのタンパク質の決まったエピトープが特定された。また同様の手法によりヒト肝切除周術期血漿から C4b が有効なマーカーペプチドとして抽出された。</p> <p>以上の研究は肝切除周術期ペプチドームのバイオマーカーとしての有用性の解明に貢献し、臨床試験における肝再生バイオマーカーの今後の発見・ブタの肝疾患モデル動物としてのさらなる利用に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 1 月 30 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
--